

# 富村沙織 論文内容の要旨

## 主 論 文

Autoantibodies against matrix metalloproteinase-1  
in patients with localized scleroderma  
(限局性強皮症における MMP-1 に対する自己抗体の頻度と臨床的意義の検討)

富村 沙織 1)、小川 文秀 1)、岩田 洋平 1)、小村 和浩 1)、  
原 肇秀 1)、室井 栄治 1)、竹中 基 1)、清水 和宏 1)、  
長谷川 稔 2)、藤本 学 2)、佐藤 伸一 1)

- 1) 長崎大学大学院医歯薬総合研究科皮膚病態学
- 2) 金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学

(Journal of Dermatological Science・52 巻 1 号 47—54 October 2008)  
〔ページ数:8〕

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻展開医療科学講座皮膚病態学分野  
(主任指導教員:佐藤伸一教授)

## 緒 言

限局性強皮症は、皮膚またはその下床の硬化性変化を主徴とする疾患である。しかし、Raynaud 症状や内臓病変を伴わず、皮膚のみに病変が限局した予後良好の疾患であり、いわゆる膠原病である全身性強皮症とは異なる疾患と考えられている。限局性強皮症は、その皮疹の形態から斑状強皮症(モルフェア)、線状強皮症、汎発型斑状強皮症の3つの亜型に分類される。限局性強皮症では、抗1本鎖DNA抗体、抗ヌクレオソーム抗体など自己抗体が検出されるため、その発症には自己免疫が何らかの機序で関与していることが推定されている。一方、限局性強皮症病変部ではI、III型コラーゲンの増加と、その分解酵素であるmatrix metalloproteinase (MMP)-1, MMP-3の発現低下が報告されている。MMP-1はI、II、III型コラーゲンを分解する酵素であり、近年、全身性強皮症ではMMP-1に対する自己抗体が出現し、MMP-1活性を抑制しうることから、抗MMP-1抗体が線維化に関与している可能性が示唆されている。しかし、限局性強皮症では、抗MMP-1抗体の関与については検討されていない。今回、我々は限局性強皮症患者における血清中抗MMP-1抗体の陽性率とその臨床的意義について検討した。

## 対象と方法

限局性強皮症患者41人、全身性強皮症患者37人、健常人34人における血清中抗MMP-1抗体値をELISA法で測定した。ELISA法は96穴プレートにMMP-1抗原を1 $\mu$ g/mlの濃度でコートし、ブロッキングを行った後、100倍に希釈した血清を加え、室温で1.5時間反応させた。4回洗浄後、ア

ルカリフォスファターゼ標識の二次抗体を加えて室温で1時間反応させた。さらに4回洗浄した後、発色させ405nmの吸光度を測定した。

免疫ブロット法を用いて、限局性強皮症患者血清中に抗MMP-1抗体が存在しているかどうかについてさらに確認した。ELISA法でIgG型抗MMP-1抗体が陽性であった限局性強皮症患者10人、IgG型抗MMP-1抗体が陰性であった限局性強皮症患者5人、健常人5人の血清を免疫ブロット法に用いた。MMP-1抗原(0.1 $\mu$ g/lane)を電気泳動の後、ニトロセルロース膜に転写し、ブロッキング後50倍に希釈した患者血清と室温で一晩反応させた。その後、アルカリフォスファターゼ標識の二次抗体と室温で1.5時間反応させ、発色を行った。

ELISA法で抗MMP-1抗体が陽性であった限局性強皮症患者6人と健常人6人の血清から抽出したIgGと、MMP-1抗原を反応させることによって、MMP-1に対する自己抗体が実際にMMP-1の活性を抑制しているかどうかを検討した。p-aminophenylmercuric acetateで活性化したMMP-1と、血清より抽出したIgGを反応させた後、ビオチン化ウシ由来コラーゲンを基質として反応させた。MMP-1によって切断されたビオチン化コラーゲン断片をビオチン結合性96穴プレートに移し、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを加えて発色させ吸光度を測定することによって、MMP-1の活性を測定した。

## 結 果

限局性強皮症患者血清中のIgG型抗MMP-1抗体価は、健常人と比べ有意に増加していた( $p<0.001$ )。全身性強皮症でも同様にIgG型抗MMP-1抗体価の増加を認めたが、限局性強皮症患者とは有意な差はなかった。またIgM型抗MMP-1抗体価は限局性強皮症および全身性強皮症患者で健常人と比べ有意な増加はなかった。また、健常人血清の平均値+2SDをcut off値としたところ、限局性強皮症患者においてIgG型もしくはIgM型の抗MMP-1抗体は46%に認められた。また、限局性強皮症の亜型別に検討すると、抗MMP-1抗体は斑状強皮症において最も発現頻度が高く(60%)、次いで線状強皮症(47%)、汎発型斑状強皮症(25%)であった。

限局性強皮症患者において、IgG型抗MMP-1抗体価は抗1本鎖DNA抗体( $r=0.443$ ,  $p<0.01$ )および抗ヌクレオソーム抗体価( $r=0.383$ ,  $p<0.05$ )と正の相関を示した。さらに、IgG型抗MMP-1抗体が陽性であった限局性強皮症患者の罹病期間は、同抗体陰性の患者と比較して有意に短かった( $p<0.05$ )。

ELISA法で抗MMP-1抗体が陽性であった限局性強皮症患者では、免疫ブロット法にて52kDaにバンドを認めたことから、抗MMP-1抗体が産生されていることが確認された。対照的に、ELISA法にて抗MMP-1抗体が陰性であった限局性強皮症患者および健常人では、免疫ブロット法にて抗MMP-1抗体は検出されなかった。

限局性強皮症由来血清中IgGが、活性化されたMMP-1の活性を抑制しているかどうか検討したところ、ELISA法にてIgG型抗MMP-1抗体が陽性であった限局性強皮症患者血清中のIgGによって、MMP-1の活性が有意に抑制された。

## 考 察

今回の実験では、MMP-1に対する自己抗体が限局性強皮症の46%に陽性になることが明らかとなった。亜型別では、抗MMP-1抗体は斑状強皮症において最も発現頻度が高く(60%)、次いで線状強皮症(47%)、汎発型斑状強皮症(25%)であった。斑状強皮症の初期病変は、皮膚硬化ではなく非特異的な紅斑などの炎症所見であることが多く、早期診断は時に困難である。従って、抗MMP-1抗体は斑状強皮症の早期診断の一助となることが期待される。さらに、抗MMP-1抗体が陽性である限局性強皮症患者の方が、同抗体陰性の患者より罹病期間が短かったことから、抗MMP-1抗体は限局性強皮症の早期から産生されていることが示唆され、このことも同抗体が早期診断に役立つ可能性を示している。

全身性強皮症患者血清より抽出したIgG型抗MMP-1抗体が、MMP-1活性を抑制することは以前

より知られている。本実験でも、IgG 型抗 MMP-1 抗体が陽性であった限局性強皮症患者血清より抽出した IgG は、MMP-1 活性を有意に抑制した。しかしながら、IgG 型抗 MMP-1 抗体の産生と、限局性強皮症の病変の個数、面積には相関が認められなかった。さらに、全身性強皮症と異なり、限局性強皮症では皮膚硬化の病変部位は多発しても連続せず、互いに孤立・散在性に認められる。全身的に産生されている抗 MMP-1 抗体が、限局性強皮症において見られる散在性の病変の発症にどの様に関与しているかについては不明である。

外傷、紫外線照射、熱傷、ステロイド局注、手術などが、限局性強皮症の誘因となることが知られている。MMP-1 の発現は、細胞成長因子や細胞伝達物質など外的シグナルによっても誘導され、創傷治癒過程でも発現することが知られている。皮膚に外傷が加わると、治癒過程においてその部位で MMP-1 の発現が誘導されるが、限局性強皮症患者では抗 MMP-1 抗体がその活性を抑制するため、線維化が進行する可能性が推測された。

以上のことから、本研究により、限局性強皮症において抗 MMP-1 抗体は診断的価値を有する新たな自己抗体であることが示された。